استخدام السلالات السريعة و البطيئة من *Lactococcus lactis ssp cremoris* في إسراع إنضاج الجبن الشبيه بالاوشاري *

1- عزل سلالات الطافرات البطيئة والسلالات السريعة وتحديد طرزها الوراثية

عامر طالب توفيق   عامر حميد سعيد الدهان

قسم الصناعات الغذائية والتقانات الاحيائية

كلية الزراعة- جامعة بغداد

المستخلص

درس تأثير عمليات النقل والتنشيط المستمرين في الحليب والأوساط M17 و GlucoseM17 (GM17) و مرق الاكتيك (LB) والحضن بدرجة الحرارة المحددة للنمو في حث الطافرات البطيئة الفاقدة لقدرة إنتاج إنزيمات البروتينيزات (-Pro) والطافرات الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز (-Lac) للسلالة *Lactococcus lactis ssp cremoris* CH-1 . وقورنت قابليات خفض الرقم الهيدروجيني وتخثير الحليب ومقدار الارتفاع بالعدد الحي في المزارع المتخثرة والقدرة على تحليل بروتينات الحليب ذات الوزن الجزيئي العالي وتأيض اللاكتوز لكل من السلالات السريعة وسلالات الطافرات البطيئة والتي تم عزلها من السلالة الأصلية CH-1 لتحديد طرزها الوراثية . لوحظت قابلية عالية للسلالة CH-1 تحت الدراسة على فقدان صفة إنتاج إنزيمات البروتينيزات وتكوين الطافرات البطيئة (الفاقدة لقدرة إنتاج إنزيمات البروتينيزات -Pro) ذاتيا نتيجة لعمليات النقل والتنشيط المستمرة في الأوساط المستخدمة في الدراسة ، وأن تلك الطافرات تمتلك القدرة على تأيض اللاكتوز (تمتلك الطراز الوراثي -Lac+Pro) ، في حين لاتكون السلالة الأصلية CH-1 طافرات ذاتية فاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز ، وأن نموها في درجة الحرارة المحددة للنمو (38 م لمدة 18 ساعة) قد أدى إلى تكوين طافرات فاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز (-Lac) . تشير هذه النتائج إلى ان صفتي إنتاج إنزيمات البروتينيزات (+Pro) وتأيض اللاكتوز (+Lac) محمولتين على بلازميدين مختلفين في السلالة الأصلية CH-1 ، وان البلازميد الحامل للصفة إنتاج إنزيمات البروتينيزات (+Pro) يفقد ذاتيا بينما يفقد البلازميد الحامل لصفة تأيض اللاكتوز (+Lac) بتأثير الحرارة المحددة للنمو .

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 107 - 124, 2005   Tawfik & Al-Dahhan

USE OF SLOW AND FAST STRAINS OF *Lactococcus lactis ssp crimoris* CH-1 IN ACCELERATING OF AUSHARY CHEESE RIPENING

1-ISOLATION OF FAST AND SLOW STRAINS WITH DETERMINATION OF ITS PHENOTYPES

A. T. Tawfic   **A. Al- Dahan**

College of Agriculture - University of Baghdad

Department of Food Sciences and Biotechnology

ABSTRACT

Successive transfer in milk, M17, glucose M17(GM17) and lactic broth (LB) were used to induce slow mutant from the parent strain of *Lactococcus lactis ssp cremores* CH-1, the incubation on the restrictive elevated temperature were used to induce lactose deficient mutant from the same strain. The slow mutant (Pro-) was isolated using the FSDA medium and lactose deficient mutant (Lac-) was isolated in lactic indicator agar (LIA). A study to compare the characteristics of fast milk coagulation ability, the level of viable count in coagulated milk culture, increasing nonprotein nitrogen level in the culture and lactose utilization ability between the isolated mutants and fast strains derived from the same parent strain were conducted. The results showed that the strain under study have grate ability to induce slow mutant spontaneously and these mutants ferment lactose (Lac+Pro-). The proteinase enzyme production and lactose fermentation ability seemed to be encoded by two separated plasmids. The plasmid which carry the Pro+ lost spontaneously while the Lac+ plasmid lost by growing in elevated temperature.

*تاريخ استلام البحث 2004/6/13 ، تاريخ قبول البحث 2005/2/28

* مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

(*)Part of M Sc. Thesis for the first author.

المقدمة

يعرف البادئ الجيد بأن له القدرة على إنتاج حامض اللاكتيك بكميات ملائمة وبمعدلات ثابتة خلال مدة إستعماله وعندما لا تكون له القدرة على ذلك يصبح بطيئا في إنتاج الحامض مما يؤثر في العملية التصنيعية(5) .

وتعد صفة إنتاج الحامض بشكل سريع من قبل بكتريا *Lactococci* من الصفات غير الثابتة في مزارعها(29) ، إذ تحتوي السلالة النقية المفردة على خلايا لا تستطيع تخثير الحليب إلا بشكل بطيء جدا عند نموها فيه (15،19) . وقد يصل معدل وجودها في البادئ إلى نسبة 1 – 2% من المجموع الكلي لخلايا المزرعة (3) . لذلك فإن مزرعة البادئ تكون غيرمتجانسة في تركيبها لاحتوائها على خلايا الطافرات البطيئة والخلايا السريعة ، ولا تظهر المزرعة صفة البطيء في تخثير الحليب إلا عندما تتراكم الطافرات البطيئة فيها بمرور الوقت بشكل يجعل نسبتها من مجموع الخلايا المزرعة أكبرمن نسبة الخلايا السريعة الأصلية (14) وتعد عمليات النقل والتنشيط و الحفظ المستمرة من أهم العوامل التي تؤدي إلى زيادة تراكم الطافرات البطيئة على حساب الخلايا السريعة اللاصلية (24) .

عرف Huggins و Sandine (18) خلايا *Lactococci* السريعة بأنها تمتلك القدرة على خفض الرقم الهدروجيني لمزرعة الحليب إلى مستوى التخثر عند الحضن لمدة 16 ساعة بدرجة 21 م أو لمدة 6 ساعات بدرجة 30 م . وقد أكد Lawrence (14) إن الخلايا البطيئة في تخثير الحليب تمتلك نفس فعالية الخلايا السريعة في إنتاج حامض اللاكتيك إلا إن تخثير الحليب في مزارعها يكون متأخرا بسبب قلة كثافتها العددية مقارنة بمزارع الخلايا السريعة عند الحضن في الظروف نفسها فهي لاتصل إلا إلى 25 % مما تصل إليها الإعداد الحية في مزارع الخلايا السريعة ولكن إنتاج الحامض في مزارعها يستمر بغياب التضاعف إلى أن يصل إلى مستوى تخثير حليب المزرعة .

تؤكد الدراسات (22 ، 24) على إن بكتريا *Lactococci* تمتلك نظاما إنزيميا محللا للبروتين مكونا من إنزيمات البروتينيزات والببتايديزات يعمل على تحويل بروتينات الحليب إلى ببتيدات قصيرة السلسلة وحوامض أمينية حرة تستطيع البكتريا استهلاكها بشكل مباشر . إن عدم قدرة خلايا الطافرات البطيئة النمو في الحليب والوصول إلى العدد نفسه الذي تصل إليه السلالة الاصلية في الظروف نفسها وعلاقة ذلك بعدم قدرة تلك الطافرات على رفع نسبة النيتروجين الذائب في الحليب خلال نموها فيه يشير إلى فقدان فعالية ذلك النظام الأنزيمي(12 ، 22 ، 24) . كما إن عدم ثبات صفة تكوين البروتينيزات في البكتريا وظهور الطافرات البطيئة الفاقدة لقدرة إنتاج تلك اللانزيمات (-Pro) بشكل مفاجئ وبتردد عالي وبطريقة غير قابلة للرجوع وإمكانية زيادة ظهور تلك الطافرات بتباع طرائق الشفاء البلازمي Plasmid curing كالتنمية في درجات حرارية محدده للنمو وإستعمال صبغة الاكريدين يشير بشكل قاطع إلى إن تلك الصفة يشفر لها وراثيا بوساطة البلازميدات (6 ، 23) . كما أجريت العديد من الدراسات باستخدام طرائق الهندسة الوراثية الحديثة من اجل تثبيت الصفات الصناعية المهمة في البادئ وبطريقة غير قابلة للفقدان (4 ، 25 ، 30 ، 37) .

طرائق العمل

أولا – الأوساط الزرعية :- استخدم وسط M17 كما وصف Terzaghi و Sandine (35) و وسط GlucoseM17 (GM17) الذي يحتوي على المكونات نفسها للوسط M17 عدا استبدال اللاكتوز 5% بالكلوكوز 5% (10) ، لتنمية السلالة الأصلية وطافراتها البطيئة وفي تجارب منحني النمو ووقت الجيل .

وأستعمل وسط أكار اللاكتيك (LA) ووسط مرق اللاكتيك (LB) ويسمى أيضا وسط Elliker لحساب العدد الحي في البادئ وفي مزارع السلالة الأصلية وطافراتها (-Lac+Pro و -Lac-Pro) وفي تجارب منحني النمو ووقت الجيل (1).

وأستعمل وسط أكار دليل اللاكتيك (LIA) كما وصف McKay وجماعته (19) لعزل الطافرات الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز(-Lac) إذ تكون تلك الطافرات على هذا الوسط مستعمرات بيضاء غير محاطة بهالة صفراء ، بينما تكون المستعمرات القادرة على تأيض اللاكتوز(+Lac) مستعمرات صفراء أكبر قطرا من مستعمرات -Lac محاطة بهالة صفراء .

وأستعمل وسط الاكار التفريقي السريع البطيء (FSDA) لعزل الطافرات البطيئة من السلالة الأصلية وكذلك لتميز الأنواع السريعة (+Lac+Pro) عن الطافرات البطيئة (-Lac+Pro)

حيث تكون مستعمرات الطافرات البطيئة على هذا الوسط ذات قطر يتراوح بين 0.2- 0.5 ملم ، شفافة ومسطحة غير حاوية على لون أصفر ولا تحاط بهالة صفراء

بينما تكون المستعمرات السريعة ذات قطر يتراوح بين 1- 3 ملم ذات لون أبيض مائل للاصفرار لماع سطحها محدب محاطة بهالة صفراء إزاء خلفية اللون لازرق للوسط (18) . وأستعمل وسط حليب بروموكريسول الأرجواني (BCP-M) في إختبارات فحص الفعالية والوقت الأدنى لتخثير الحليب

لكل من السلالات السريعة والطافرات البطيئة المعزولة من السلالة الأصلية (1). وأستخدمت طريقتي الزرع الصب بالأطباق والتلقيح السطحي في تجارب منحني النمو وعزل الطافرات البطيئة (16)

ثانيا – عزل الطافرات البطيئة :- أستخدمت طريقة النقل والتنشيط المتعاقب ثم الخزن بدرجة حرارة الثلاجة (4 م) في الحليب والأوساط التركيبية M17 وGM17 و LB للسلالة الأصلية CH-1 لحث الطافرات البطيئة ذاتيا وأستعملت المزارع الأخيرة (السادسة في حالة استخدام الحليب الفرز كوسط والعاشرة في حالة إستعمال الأوساط التركيبية) لعزل الطافرات البطيئة على وسط FSDA (18) . بعد الحضن إنتخبت 26 و 20 مستعمرة تعطي الصفات المظهرية للطافرات البطيئة من أطباق وسطFSDA الخاصة بمزارع الحليب الفرز والأوساط التركيبية الثلاث على التوالي وفي الوقت نفسه إنتخبت 11 مستعمرة تعطي الصفات المظهرية للخلايا السريعة من أطباق FSDA الخاصة بمزارع الحليب الفرز لأجراء الفحوص التأكيدية ودراسة خواصها.

نقلت كل المستعمرات المنتخبة إلى قناني تحتوي على 5 مل من وسط BCP-M وحضنت بدرجة 30 م إلى أن تم الحصول على تخثر متجانس للحليب.

ثالثا – تشخيص ودراسة خواص عزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة :-

1- الوقت الأدنى لتخثير الحليب :- أجري الفحص كما وصف Huggins و Sandine (18) ، وعرفت المزارع البطيئة بأنها تلك التي لا تستطيع تخثير الحليب عند حضنها لمدة 16 ساعة بدرجة 20 م أو عند حضنها لمدة 8 ساعات بدرجة 30 م.

2- فحص الفعالية :- تم كما في (29) ،عين مقدار الحموضة المتطورة بقياس الرقم الهيدروجيني النهائي للمزرعة .

إنخفاض الرقم الهيدروجيني إلى 5 أو أقل يدل على نشاط مثالي للمزرعة . وقد تم حساب العدد الحي في مزارع الحليب المتخثرة باستخدام التخافيف الملائمة وطريقة الصب بالأطباق في وسط LA .

3 – القابلية على تحليل بروتينات الحليب :- استخدمت طريقة Hull وكما وصفها Sample وجماعته (27) . كما تم إعداد منحنى التايروسين القياسي للتعرف على مقدار النيتروجين الذائب في المزارع تحت الفحص ونمط تحليل بروتينات الحليب خلال وقت الحضن لعزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة .

4 – قابلية تأيض اللاكتوز :- جرى كما ذكر Steenson و Klaenhammer (32) .

رابعا– منحنى النمو ووقت الجيل :- لقح الوسط المستعمل بمقدار 1% من مزرعة بعمر 18 ساعة منماة في الوسط نفسه ، وعند إستعمال الحليب كوسط يتم تتبع تطور الحموضة فيه بقياس مقدار الانخفاض في الرقم الهيدروجيني . وحسب العدد الحي خلال وقت الحضن للتعرف على منحنى النمو ووقت الجيل (31) .

خامسا – النمو في الحليب المدعم بمهضوم الكازين :- أختبر نمو مزارع سلالات الطافرات البطيئة A3 وA8 وA9 وA17 و A25 بوجود 1% و3% و 5% من مهضوم الكازين في الحليب باستعمال 2% من المزارع المتخثرة للسلالات المنتخبة والحضن بدرجة 35 م لمدة 5 ساعات ، بعد صفر و 2 و 5 ساعات من الحضن تم سحب 5 مل من كل قنينة يستخدم 1 مل منها لحساب العدد الحي و 4 مل لقياس الرقم الهيدروجيني ، وأستعمل حليب ملقح غيرمضاف له مهضوم الكازين كتجربة مقارنة ، كما لقحت المزرعة اللاصلية بنسبة 2% وأجري عليها نفس الفحص كتجربة مقارنة أخرى .

سادسا – التحري عن الطافرات الذاتية الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في السلالة الأصلية CH-1 :- استخدمت طريقة McKay وجماعته (19).

سابعا – عزل طافرات -Lac المحثة بالحرارة المحددة للنمو من السلالة الأصلية CH-1 :- لتحديد درجة الحرارة المحددة لنمو السلالة الاصلية تم تلقيح أنابيب حاوية على LB بنسبة 2% من مزارع LB للسلالة الاصلية .حضنت الانابيب الملقحة بدرجات الحرارة 35 و 38

و 40 لمدة 18 ساعة تم حساب العدد الحي قبل وبعد الحضن في وسط LA وعزلت طافرات -Lac من مزرعة السلالة اللاصلية كما في (21) وسميت عزلة الطافرة هذه بالسلالة ALac-1 .

النتائج والمناقشة

أولاً- تراكم الطافرات البطيئة في مزارع السلالة الأصلية :-

تراكمت الطافرات البطيئة في مزارع السلالة الاصلية المنماة على الحليب كوسط زرعي خلال عمليات النقل والتنشيط ثم الخزن المتتالي . إذ لوحظ عدم قدرة المزارع المنشطة من النقلتين الخامسة والسادسة على تخثير الحليب بعد تلقيحه بنسبة 1% وحضنه بدرجة 20 م لمدة 18 ساعة . وباستعمال وسط FSDA ظهر إن الطافرات البطيئة في تلك المزارع قد بلغ نسبة 85.26 % من المجموع الكلي للخلايا فيها ، مما يدل على إن إجراء عمليات النقل والتنشيط والخزن لست مرات متتالية قد أظهر وجود تلك الطافرات بشكل واضح . وان ارتفاع مستوى تلك الطافرات في المزارع إلى هذا الحد قد أكسب تلك المزارع صفات المزرعة البطيئة على الرغم من احتوائها نسبة 14.74 % خلايا سريعة والتي يمكن أن تجهز الطافرات البطيئة بالحوامض الأمينية الأساسية لنموها . أوضح Hugenholtz وجماعته (17) إن مزرعة بادئ السلالات Wg2 و E8 لبكتريا *Lactococcus lactis ssp cremoris* تعطي صفات المزرعة السريعة رغم احتوائها على 92% من خلاياها بشكل طافرات بطيئة ، لذلك لا تظهر مزرعة البادئ صفة البطيء في تخثير الحليب حتى وان احتوت على نسبة مرتفعة من الطافرات البطيئة من مجموع خلاياها وذلك بسبب وجود الخلايا السريعة فيها ولكن في اللحظة التي لا تستطيع فيها الخلايا السريعة سد حاجتها وحاجة الطافرات البطيئة من الحوامض الأمينية الجاهزة ، فان تلك المزرعة سوف تظهر البطيء في صفة تخثير الحليب . ولمعرفة تأثير اختلاف وسط النمو في عملية تراكم الطافرات البطيئة في مزارع السلالة اللاصلية ، أجريت عمليات النقل والتنشيط والخزن المتتالية في الاوساط M17 و GM17 و LB لعشر نقلات متتالية . عند الفحص عن وجود الطافرات البطيئة في مزارع النقلة العاشرة للأوساط الثلاثة باستعمال الوسط FSDA وجد ان جميع خلايا المزارع قد تحولت 100% إلى طافرات بطيئة ولم تظهر مستعمرات تعطي الصفات المظهرية للخلايا السريعة في جميع المزارع . إن إحتواء الاوساط التركيبية على مركبات نايتروجينية جاهزة للاستهلاك بشكل حوامض أمينية حرة وببتيدات قصيرة السلسلة قد يشجع بشكل غير مباشر فقدان صفة +Pro في هذه السلالة ، إذ يعمل وجود مثل تلك المواد على منع أو تثبيط تخليق البروتينيزات فضلا على تأثير عمليات النقل والتنشيط التي تشجع فقدان البلازميدات التي تشفر لتلك اللانزيمات ومن ثم فقدان تلك الصفة (7 ، 34) .

تشير هذه النتائج إلى إن السلالة تحت الدراسة تميل بشكل كبير إلى فقدان صفة إنتاج إنزيمات البروتينيزات +Pro ذاتيا خلال عمليات النقل والتنشيط والحفظ باستعمال الحليب والأوساط M17 و GM17 و LB والمستعملة بشكل واسع في تنمية بكتريا البادئ .

ثانيا- بعض خواص مزارع عزلات الطافرات البطيئة مقارنة بمزارع العزلات السريعة :-

الوقت الادنى لتخثير الحليب:- تظهر الجداول (1 و 2 و 3 و 4 و5) الوقت الذي تستغرقه العزلات البطيئة والسريعة لتخثير حليب مزارعها ، ويلاحظ ان مزارع الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية إستغرقت 20 - 48 ساعة لتغير لون الدليل (خفض الرقم الهيدروجيني للمزرعة من 6.7 إلى 5.4) و28 - 72 ساعة لتخثير حليب المزرعة (4.7 pH) عند الحضن بدرجة 30 م ، في حين إستغرقت 22- 48 م ساعة لتغير لون الدليل و39 - أكثر من 72 ساعة لتخثير حليب المزرعة عند الحضن بدرجة 20 م (جدول 1) . أما مزارع الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 وGM17 و LB للسلالة الأصلية فقد إستغرقت 18 ساعة لتغير لون الدليل و 24 ساعة لتخثير الحليب عند حضنها بدرجة 30 م وإستغرقت 38 ساعة لتغير لون الدليل و24 ساعة لتخثير حليب المزرعة عند حضنها بدرجة 20 م (الجداول 2 و 3 و 4) تعد درجتي 20 م و 30 م الحد اللادنى واللاعلى الأمثل لنمو وتضاعف سلالات بكتريا Mesophilic Lactococci (33) وقد استطاعت العزلات السريعة إحداث التخثر الحامضي في الحليب خلال 7.5 ساعة بدرجة 30 م (جدول 5) ، بينما احتاجت عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية 4- 10 أضعاف تلك المدة (28- 72 ساعة) (جدول 1) ، كما استغرقت عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 و GM17 وLB للسلالة الأصلية 5 - 10 أضعاف تلك المدة (39- 72 ساعة) (الجداول 2

و 3 و 4) واستطاعت مزارع العزلات السريعة إحداث التخثر الحامضي في مزرعة الحليب خلال 20 ساعة عند حضنها بدرجة 20 م ، بينما تطلبت مزارع الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الحليب و الأوساط التركيبية الثلاث للسلالة اللاأصلية 2- 3.5 أضعاف ذلك الوقت لإحداث التأثير نفسه (24 ساعة) (الجداول 1 و 2 و 3 و 4 و5) . يرجع سبب ذلك إلى فقدانها لإنتاج إنزيمات البروتينيزات (14 ، 26) .

جدول 1. بعض خصائص مزارع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة اللاأصلية عند نموها في الحليب الفرز(4) .

رقم العزلة	الوقت بالساعات لتغير لون الكاشف بدرجة		الوقت بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة		PH النهائي لفحص الفعالية (1)	العدد الحي في المزرعة المتخثرة (10^8) (2)	مايكروغرام تايروسين/ مل من حليب المزرعة(3)
	30 م	20 م	30 م	20 م			
1	20	22	28	39	6.30	1.82	21.05
2	20	22	28	39	6.33	0.97	23.2
3	20	22	28	40	6.51	1.60	18.0
4	20	22	28	39	6.33	1.91	*14.29
5	20	22	28	39	6.42	*1.99	17.52
6	20	22	28	39	6.40	1.42	19.41
7	20	22	28	39	*6.58	0.85	16.94
8	48	48	72	أكثر من 72	6.29	1.82	20.0
9	48	48	72	أكثر من 72	6.42	0.89	18.58
10	22	22	28	أكثر من 72	6.20	1.06	20.58
11	22	48	28	39	6.35	1.92	19.41
12	22	24	28	39	6.21	1.33	22.11
13	22	24	28	39	6.25	0.86	21.77
14	40	48	72	أكثر من 72	6.32	1.04	17.29
15	40	48	72	أكثر من 72	6.38	1.9	15.64
16	40	48	72	أكثر من 72	6.43	*0.49	17.05
17	22	24	28	39	6.22	1.42	15.52
18	22	24	28	48	6.27	1.58	16.47
19	22	24	28	39	6.36	0.99	16.32
20	22	40	28	48	6.30	1.82	19.17
21	22	40	28	48	6.21	1.44	20.58
22	22	40	28	48	6.25	1.51	14.42
23	22	48	28	72	6.51	1.30	19.52
24	22	24	28	39	* 5.15	1.62	21.17
25	22	24	28	39	6.52	1.80	*23.29
26	22	24	28	39	6.35	0.80	14.58

(1) الرقم الهيدروجيني بعد تلقيح الحليب بمقدار 2% والحضن بدرجة 35 م لمدة 5 ساعات (pH الحليب قبل الحضن 6.70 - 6.80)
(2) تلقيح الحليب بمقدار 1 % وحضن بدرجة 30 م حتى الحصول على التخثر في المزرعة .
(3) مزرعة ملقحة بمقدار 1% وحضن بدرجة 30 م حتى التخثر ثم يقدر التايروسين بطريقة Hull .
(4) كل العزلات تستهلك اللاكتوز عند تنميتها على وسط LIA ، فهي تمتلك الطراز الوراثي Lac+Pro- .
(*) تشير إلى أعلى وأقل قيمة .

2 – فحص الفعالية :– تراوح مقدار التغير في الرقم الهيدروجيني لمزارع حليب العزلات السريعة عند فحص الفعالية بين 1.65 – 2.1 ، في حين كان في مزارع العزلات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية يتراوح بين 0.17 – 0.60 (جدول 1 و 5) في حين كان في مزارع حليب العزلات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 و GM17 و LB بين 0.42 – 0.64 و 0.42 – 1.1 و 0.37 – 0.71 على التوالي (جدول 2 و 3 و 4) وهذا يشير إلى أن مزارع العزلات البطيئة المعزولة من السلالة الأصلية تتأخر كثيرا عن مزارع العزلات السريعة في زيادة تراكم الحامض خلال فحص الفعالية (13) .

جدول 2. بعض خصائص عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الوسط M17 للسلالة الأصلية عند نموها في الحليب الفرز(4) .

رقم العزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة		(1) PH النهائي PH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمستعمرة / مل (10 ^ 8)	(3) مايكروغرامسمايكروغرام تايروسين / مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20م	30 م			
1	38	18	42	24	* 6.11	1.32	18
2	38	18	42	24	6.23	1.45	15.76
3	38	18	42	24	6.25	1.81	17.52
4	38	18	42	24	6.23	0.97	15.29
5	38	18	42	24	6.20	0.94	16.94
6	38	18	42	24	6.21	1.15	16.0
7	38	18	42	24	6.23	1.15	15.88
8	38	18	42	24	6.22	* 0.89	* 14.81
9	38	18	42	24	6.25	1.3	17.05
10	38	18	42	24	* 6.30	1.1	15.64
11	38	18	42	24	6.33	1.35	17.41
12	38	18	42	24	6.13	1.21	15.52
13	38	18	42	24	6.25	1.32	21.05
14	38	18	42	24	6.21	1.43	19.78
15	38	18	42	24	6.20	1.91	19.41
16	38	18	42	24	6.27	1.21	17.71
17	38	18	42	24	6.23	* 1.89	21.05
18	38	18	42	24	6.22	1.10	22.23
19	38	18	42	24	6.28	1.85	15.88
20	38	18	42	24	6.28	0.99	*22.82

(1) و (2) و (3) و (4) كما في جدول (1)

3 – العدد الحي في مزرعة الحليب المتخثرة :– لم تصل الكثافة العددية في مزارع الحليب المتخثرة لعزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية إلا إلى 17- 26% من كثافتها في مزارع العزلات السريعة (الجداول 1 و 5) . وبلغت في مزارع الحليب المتخثرة لعزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الاوساط M17 وGM17 وLB للسلالة الأصلية 25-31% و 25-34% و 27-34% من الكثافة العددية في المزارع المتخثرة للعزلات السريعة (الجداول 2 و 3 و 4 و 5) . إن الكثافة العددية في مزارع حليب الطافرات البطيئة لاتزيد عن 20 – 25% من تلك التي تصلها الخلايا السريعة لنفس السلالة عند نموها في الحليب (14) و إن تخثير الحليب في مزارع الطافرات البطيئة يتأخر عن مزارع العزلات السريعة نتيجة لانخفاض العدد الكلي فيها ، إلا إن إنتاج الحامض في مزارع الطافرات البطيئة يستمر بغياب التضاعف عند تمديد فترة الحضن إلى أن يتم خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب إلى مستوى التخثر (2 ، 34) .

4– قابلية تحليل بروتينيات الحليب :– إستطاعت العزلات السريعة المعزولة من مزارع حليب السلالة اللاصلية رفع مستوى النيتروجين غير البروتيني (مقدر بالتايروسين) إلى 86.47 – 104.94 مايكروغرام / مل عند حضنها في

جدول 3. بعض خصائص عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الوسط GM17 للسلالة الأصلية عند نموها في الحليب الفرز(4) .

رقم عزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة		الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة		(1) pH النهائي PH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة المستعمرة /مل (10 ^ 8)	(3) مايكروغرام ميكروغرام تايروسين/ مل من حليب المزرعة
	20 م	30 م	20 م	30 م			
					*5.65		ال
1	38	18	42	20	5.71	1.81	21.76
2	38	18	42	20	5.95	1.80	18.47
3	38	18	42	20	5.78	1.63	19.41
4	38	18	42	20	6.05	1.53	22.58
5	38	18	42	20	6.07	1.44	21.52
6	38	18	42	20	6.19	1.80	19.88
7	38	18	42	20	6.08	1.0	21.88
8	38	18	42	20	5.90	1.41	* 16
9	38	18	42	20	6.1	1.34	18.95
10	38	18	42	20	5.97	* 1.91	17.05
11	38	18	42	20	6.03	1.33	* 22.82
12	38	18	42	20	6.22	1.90	15.88
13	38	18	42	20	* 6.33	* 0.79	17.05
14	38	18	42	20	6.26	1.21	17.41
15	38	18	42	20	6.09	1.11	21.52
16	38	18	42	20	6.17	1.45	20.58
17	38	18	42	20	5.98	1.89	17.88
18	38	18	42	20	6.10	1.01	17.05
19	38	18	42	20	6.23	1.92	17.47
20	38	18	42	20		1.53	19.52

(1) و (2) و (3) و (4) كما في جدول (1)

الحليب (الجدول 5) ، في حين لم تستطع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع حليب السلالة الأصلية زيادة كميته إلا بنسبة بلغت 16-22% من تلك الموجودة في مزارع العزلات السريعة (جدول 1) أما العزلات البطيئة المعزولة من مزارع الأوساط M17 وGM17 و LB لسلالة الأصلية فلم تصل إلا إلى نسبة 17-21% و 16-21% و 17-21 % على التوالي من تلك الموجودة في مزارع العزلات السريعة (الجداول 2 و 3 و 4) .

أشار Citti وجماعته (3) إلى أن قابلية تحليل البروتينيات التي تمتلكها خلايا السلالة الأصلية تزيد بأربعة أضعاف على قابلية تحليل البروتينات للطافرات البطيئة التي تم عزلها من نفس السلالة الأصلية . ونتيجة لفقدان الطافرات البطيئة إنزيمات البروتينيزات سوف تنخفض كثافتها العددية عن تلك التي تصل لها الخلايا السريعة عند نموها في الحليب وتقل سرعتها في خفض الرقم الهيدروجيني لتخثير الحليب (26) . تمتلك بكتريا Lactococci عددا من إنزيمات البروتينيزات والببتيديزات التي لها القدرة على تحليل بروتينات الحليب ذات الأوزان الجزيئية العالية لتحويلها إلى حوامض أمينية حرة وتعد تلك الإنزيمات الحجر الأساس في عملية إنضاج الجبن (8 ، 36) .

5 – قابلية تأيض اللاكتوز :- أظهر اختبار تأيض اللاكتوز لمزارع عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الحليب والأوساط التركيبية الثلاث للسلالة الأصلية ، أن جميع تلك المزارع تمتلك القدرة على تأيض اللاكتوز عند

جدول 4. بعض خصائص عزلات الطافرات البطيئة المعزولة من مزارع الوسط LB للسلالة الأصلية عند نموها في الحليب الفرز (4) .

رقم العزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة 20 م	30 م	الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة 20 م	30 م	(1) pH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمستعمرة / مل (8 ^ 10)	(3) مايكروغرام تايروسين / مل من حليب المزرعة
1	36	18	40	24	6.07	1.63	15.79
2	36	18	40	24	6.05	* 2.10	21.17
3	36	18	40	24	6.05	2	22.11
4	36	18	40	24	* 6.63	1.50	17.14
5	36	18	40	24	6.27	1.65	18.58
6	36	18	40	24	6.32	1.43	19.41
7	36	18	40	24	6.33	1.47	* 14.51
8	367	18	40	24	6.38	1.25	16.70
9	36	18	40	24	6.15	1.67	15.88
10	36	18	40	24	6.15	1.58	* 22.81
11	36	18	40	24	6.10	1.22	16.82
12	36	18	40	24	6.35	* 0.97	16.91
13	36	18	40	24	* 6.04	1.01	19.17
14	36	18	40	24	6.21	1.52	17.88
15	36	18	40	24	6.04	1.77	17.53
16	36	18	40	24	6.07	1.08	18.47
17	36	18	40	24	6.19	1.95	18.47
18	36	18	40	24	6.09	1.05	17.88
19	36	18	40	24	6.11	1.18	19.41
20	36	18	40	24	6.09	1.89	21.05

(1) و(2) و(3) و(4) كما في الجدول (1)

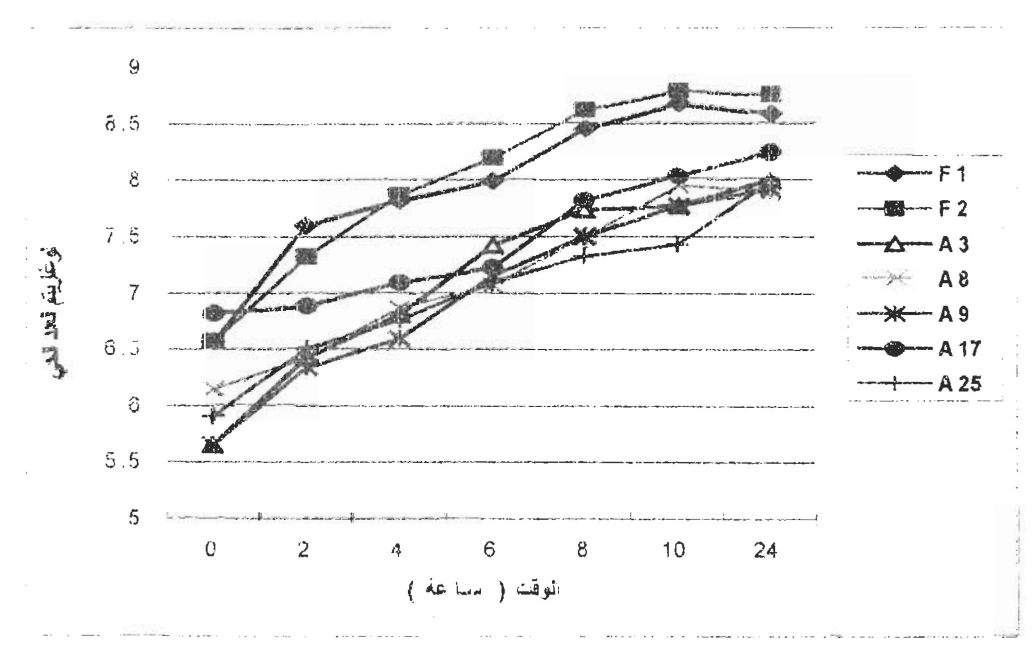
جدول 5. بعض خصائص العزلات السريعة المعزولة من مزارع حليب السلالة الاصلية عند تنميتها في الحليب الفرز(4) .

رقم العزلة	الوقت اللازم بالساعات لتغير لون الدليل بدرجة 20 م	30 م	الوقت اللازم بالساعات لتخثير حليب المزرعة بدرجة 20 م	30 م	(1) pH النهائي لفحص الفعالية	(2) العدد الحي في المزرعة المتخثرة وحدة مكونة للمستعمرة /مل (8 ^ 10)	(3) ميكروغرام تايروسين / مل من حليب المزرعة
1	6	16	20	7.5	5.01	* 2.79	* 86.47
2	6	16	20	7.5	4.94	4.85	95.88
3	5.5	16	20	7.5	* 4.65	5.5	*104.94
4	6	16	20	7.5	4.90	* 7.55	94.23
5	5.5	16	20	7.5	5	6.81	97.88
6	5.5	16	20	7.5	* 5.10	3.75	93.52
7	5.5	16	20	7.5	4.84	5.42	104.11
8	5.6	16	20	7.5	4.92	4.31	89.05
9	5.5	16	20	7.5	4.95	4.22	95.64
10	5.5	16	20	7.5	4.99	5.65	93.76
11	5.5	16	20	7.5	4.67	6.35	100.35

(1) و(2) و(3) و(4) كما في الجدول (1)

تنميتها في وسط LIA (الجداول 1 و 2 و 3 و 4) ، حيث لم تحتوي أي مزرعة من تلك المزارع على أية مستعمرات تظهر الصفات الخاصة بطافرات -Lac . أي أن عمليات النقل والتنشيط المستمرة في الحليب والأوساط الثلاث لاتؤثر على فقدان هذه الصفة (9،12) . إن الاختلافات الكبيرة الواضحة بين عزلات الطافرات البطيئة والعزلات السريعة في قابلة خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب ورفع مستوى النتروجين الذائب فيه والقدرة على تأيض اللاكتوز في وسط LIA والاختلاف بمستويات الكثافة العددية في المزارع المتخثرة يشير إلى إن جميع عزلات الطافرات البطيئة التي تم انتخابها تمتلك الطراز الوراثي -Lac+Pro (10، 32) ، مما يدل على عدم إرتباط الصفتين وراثيا في هذه السلالة ومن المحتمل أن تكون كل صفة محمولة على بلازميد يختلف في صفاته عن بلازميد الصفة الاخرى كما تشير هذه النتائج إلى أن عمليات النقل والتنشيط المستمرة والحفظ بدرجة حرارة الثلاجة في كل من الحليب ولأوساط التركيبة الثلاث أدت دورا مهما في فقدان البلازميد المشفر لصفة +Pro ، وأن تلك العملية لا تؤثر في البلازميد الذي يشفر للصفة +Lac (12،24) . أنتخبت العزلات البطيئة المرقمة 3 و 8 و 9 و 17 و25 والمعزولة من مزارع الحليب الفرز (الجدول 1) واعتبرت سلالات بطيئة فاقدة القدرة إنتاج البروتينيزات ورمز لها A3 و A8 و A9 و A17 و A25 كما انتخبت العزلتان السريعة المرقمة 1 و 2 وسميت السلالات F1 و F2 وذلك لإجراء بقية الدراسة عليها (الجدول 5) .

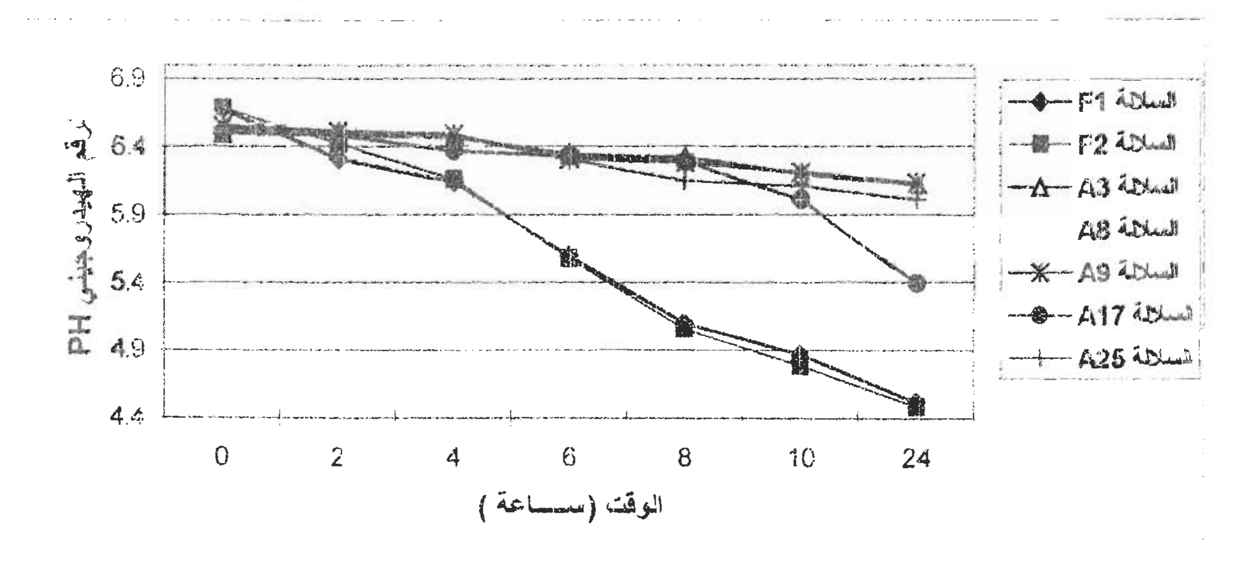
ثالثا – منحنى النمو ووقت الجيل ونمط إنخفاض الرقم الهيدروجيني في الحليب :- يظهر الشكل (1) منحنى نمو سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 والسلالات السريعة F1 و F2 المنتخبة في الحليب ، ويظهر نمو سلالات الطافرات البطيئة متخلفا عن نمو السلالات السريعة خلال مدة الحضن وكان العدد الأولي في مزارع السلالات السريعة أكثر منه في مزارع سلالات الطافرات البطيئة بمقدار2.5- 5 أضعاف رغم استعمال نسبة التلقيح نفسها لكل المزارع الداخلة في التجارب ، ويرجع سبب ذلك إلى انخفاض العدد الكلي في المزارع المتخثرة لسلالات الطافرات البطيئة عنه في مزارع السلالات السريعة (11 ، 34) . كان النمو لكل سلالات الطافرات البطيئة لوغاريتميا رغم عدم امتلاكها إنزيمات البروتينيز ويرجع سبب ذلك إلى احتواء الحليب على نسبة 0.01 % من بروتيناته بشكل نتروجين ذائب فضلا على أن عمليات التعقيم التي تجري على الحليب تعمل على رفع تلك النسبة (11 ، 14) . إن انخفاض العدد الحي في بداية النمو يقلل من حدة التنافس بحيث يمكن للخلايا الاعتماد على تلك النسبة للتضاعف والنمو ولا تظهر عندها أهمية أنزيمات البروتينيز . استمرت هذه الحالة لسلالات الطافرات البطيئة تحت الدراسة لمدة عشر ساعات بعد التلقيح والحضن ونتج عنه الطور اللوغاريتمي لهذه السلالات . وفي اللحظة التي ينخفض فيها النتروجين الجاهز نتيجة لزيادة أعداد الخلايا في المزرعة فيصبح هو العامل المحدد للنمو إذ يستهلك بشكل تنافسي ونتيجة لذلك سيكبح نمو السلالات البطيئة ، فيصبح عدم امتلاك البروتينيزات مفتاح النمو والتضاعف لذلك تدخل السلالات البطيئة طور الثبوت (34) .



شكل 1. منحنى النمو للسلالات السريعة F 1 و F 2 وسلالات الطافرات البطيئة A1 و A 2 و A 8 و A 17 و A 25 في الحليب الفرز خلال 24 ساعة بدرجة 30 م .

يظهر منحني نمو السلالة A17 تـأثير زيـادة العـدد الأولي (وقت الصفر) في نمط نمو السلالات البطيئـة تحت الدراسة إذ تم التلقيح بنسبة 4% لرفع كثافة العـدد اللاولي في مزارع تلك السلالات إلى 8.5 ضعفا عمـا هو عليه في بقية السلالات البطيئة فلم تمتلـك هـذه السلالة منحنى نمو موازيا لمنحنـى نمـو السـلالات البطيئة والسريعة ولكن الزيادة بـالعدد الحـي كـانت متدرجة ولم يظهر فيها النمو اللوغاريتمي كما هو فـي بقية السلالات البطيئة حتى تصل نقطة تكون موازيـة لمنحنى نمو بقية سلالات الطافرات البطيئة لتقطع وقتـا قصيرا في الطور اللوغاريتمي (2 سـاعة) مقارنـة بالوقت الذي تقطعه بقية سلالات الطـافرات البطيئـة لتدخل معها طور الثبوت . أشـار Thomas و Mills (34) إلى أن زيادة الكثافة العددية في مزارع السلالات السريعة باستمرار يؤدي بشكل غير مباشر إلى زيـادة تركيز إنزيمات البروتينيزات لذلك سوف تكون منتجات التحلل البروتيني متوفرة في الوسط . وعندمـا تكـون عملية تجهيز هذه المنتجات أكبر من استهلاكها من قبل الخلايا ، يكون النمو لوغاريتميا ومن ثم لاتعد عمليـة توفر المصدر النيتروجيني العامل المحدد للنمـو فـي المزرعة . بينما في مزارع سلالات الطافرات البطيئـة لاتكون منتجات التحلل البروتيني العامل المحدد للنمـو عندما يكون عدد الخلايا قليلا . حيث تسـتطيع تلـك الخلايا الاعتماد على النيـتروجين غـير الـبروتيني الموجود في الحليب . ولكن زيادة أعداد الخلايا البطيئة في المزرعة لا يصاحبها زيادة في منتجـات التحلـل البروتيني ، مما يجعـل عمليـة اسـتهلاك المصـدر النيتروجيني أكبر من عملية تراكم منتجـات التحلـل النيتروجيني ، مما يؤدي زيادة التنافس على المصـدر النيتروجيني ليكون هو العامل المحدد للنمو في مزرعة الحليـــب بعــد انقضـــاء مـــدة

شكل رقم 2. الانخفاض بالرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب الفرز خلال 24 ساعة بدرجة 30 م للسلالات السريعة F1 و F2 و سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 .

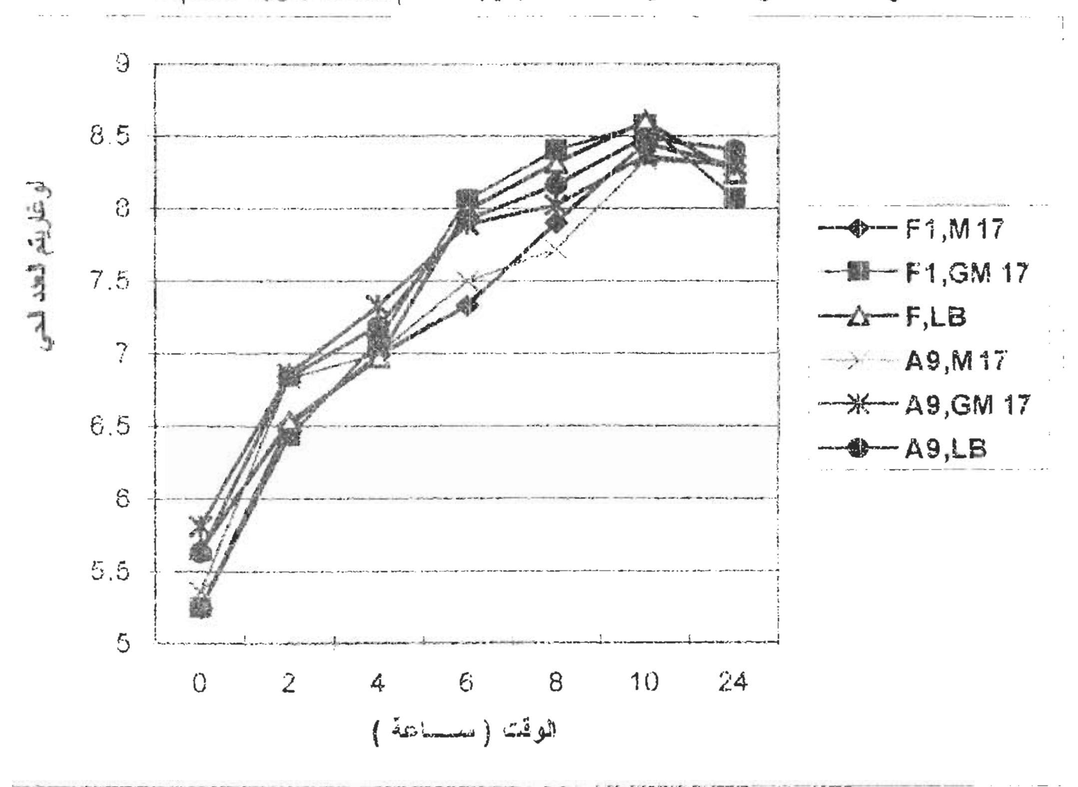


الحضن ، إمتلكت السلالتين السريعة F1 و F2 وقـت جيل مقداره 114 و 84 دقيقة على التوالي كمـا كـان وقت الجيل للســلالات البطيئــة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 82 و 101 و 92 و 99 و 126 دقيقـة على التوالي . يظهر الشكل (2) نمط انخفاض الرقـم الهيدروجيني في مزرعة الحليب الفـرز عنـد تنميـة عزلات الســلالات الســريعة F1 و F2 وسـلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 فيه إذ أفترق منحني الانخفاض في قيمة الرقم الهيدروجيني للسلالات السريعة عنه في سلالات الطافرات البطيئـة

بعد مرور أربع ساعات من الحضن ، إذ بلغت الكثافة العددية في مزارع السلالات السريعة في ذلك الوقت إلى عشرة أضعاف مقارنة بمزارع سلالات الطافرات البطيئة ، ففي هذا الوقت كان مقدار التغير في قيمة pH مزارع السلالات السريعة F1، F2 0.56 و 0.52 على التوالي في حين كان بمقدار 0.02 و 0.02 و 0.04 و 0.02 و 0.02 لسلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 على التوالي . وبعد مرور 24 ساعة من الحضن أصبح مقدار التغير في قيمة الرقم الهيدروجيني للسلالات السريعة F1 و F2 2.15 و 2.19 على التوالي ولسلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 0.38 و 0.58 و 0.42 و 1.11 و 0.52 على التوالي ، تشير هذه النتائج إلى عدم وجود علاقة بين عملية إنتاج الحامض والتضاعف في السلالات تحت الدراسة وأن الكثافة العددية للمزرعة هي التي تتحكم بخط انخفاض الرقم الهيدروجيني (2 ، 3) .

رابعا - منحنى النمو ووقت الجيل في الأوساط التركيبية :- تم تنمية سلالات الطافرة البطيئة A9 والسلالة السريعة F1 على الأوساط التركيبية M17 و GM17 و LB للتعرف على تأثير نوع المصدر الكاربوني على طبيعة نمو تلك السلالتين في الأوساط التركيبية ، وكما يظهر في الشكل (3) كانت المنحنيات متوازية مع بعضها

شكل رقم 3. منحنى نمو السلالة السريعة F 1 و سلالة الطافرة البطيئة A 9 في الأوساط التركيبية الثلاث M 17 و GM 17 و LB خلال 24 ساعة بدرجة 30 م .ساعة بدرجة 30 م .

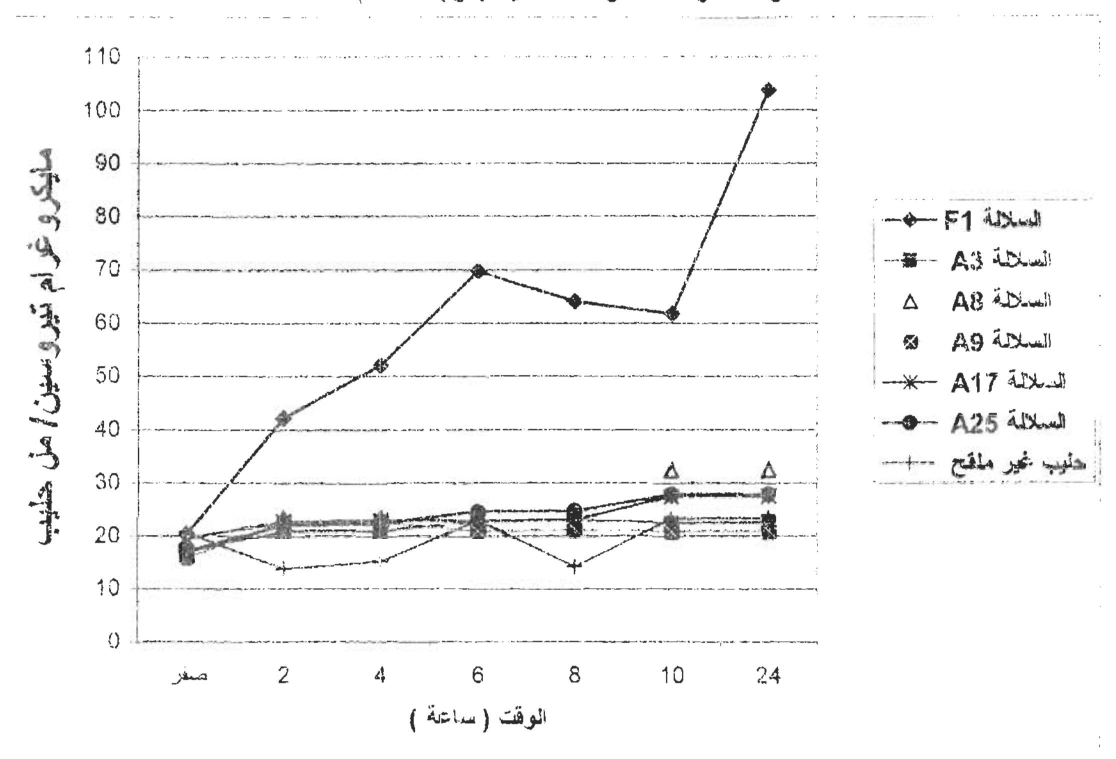


وعلى الرغم من أن سلالة الطافرة A9 فاقدة لقدرة إنتاج البروتينيزات المرتبطة بالجدار الخلوي ، فأن الاوساط الثلاثة تدعم نمو كلا نوعي الخلايا +Pro و -Pro وبالشكل الذي لا تتأثر فيه خلايا -Pro بالعطب الذي تحمله ، ويظهر أيضا من الشكل أن نمو كلا السلالتين لوغاريتميا في الاوساط الثلاث . بلغ وقت الجيل للسلالة F1 في الاوساط M17 و GM17 و LB مقدار 78 و 44 و 49 دقيقة على التوالي ، وبلغ للسلالة A9 في الاوساط M17 و GM17 و LB مقدار 99 و 69 و 82 دقيقة على التوالي. ويلاحظ أن كلا السلالتين تمتلكان وقت جيل في وسط GM17 يقل عنه في وسطي M17 و LB وأن وقت الجيل في وسط LB لكلا السلالتين يقل عنه في وسط M17 ، قد يرجع سبب ذلك إلى سهولة استخدام الكلوكوز كمصدر كاربون من قبل هذه البكتريا (19 ، 9).

خامسا - نمط تحليل بروتينات الحليب خلال وقت الحضن :- يظهر الشكل (4) قدرة السلالة السريعة F1 على رفع مستوى النتروجين غير البروتيني (الذائب) في الحليب عند النمو فيه لمدة 24 ساعة بدرجة 30 م . إذ زادت كميته بمقدار 31.76

مايكروغرام تايروسين / مل من الحليب بعد حضنها لمدة أربع ساعات ، بينما لم تتمكن سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 من رفع مستواه في الحليب إلا بنسبة 40% و 44% و 43% و 42% على التوالي عما هو عليه في مزرعة السلالة السريعة F1 بعد أربع ساعات من الحضن . ووصل مستواه إلى 103.76 مايكروغرام / مل من المزرعة في السلالة F1 بعد مرور 24 ساعة في حين لم يصل إلا إلى

الشكل 4. نمط التحلل البروتيني في الحليب عند نمو السلالة السريعة F1 و F2 وسلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 فيه بدرجة 30 م لمدة 24 ساعة .



21% و 31% و 20% و 26% و 26% في مزارع سلالات الطافرات البطيئة على التوالي من مستواه في مزارع السلالة F1 . مما يشير إلى أن سلالات الطافرات البطيئة فاقدة تماما لقدرة استعمال بروتينات الحليب ذات الوزن الجزيئي العالي كمصدر نيتروجيني (7 ، 12 ، 17) .

سادسا – تأثير تدعيم الحليب بمهضوم الكازين :–
يظهر الجدول (6) العدد الحي لمزارع سلالات الطافرات البطيئة A3 و A8 و A9 و A17 و A25 في الحليب والحليب المضاف له مهضوم الكازين بثلاث تراكيز 1% و 3% و 5% وكذلك مقدار الانخفاض بالرقم الهيدروجيني للمزارع خلال وقت صفر و 2 و 5 ساعات من التلقيح والحضن ، ويبدو إن إضافة مهضوم الكازين قد شجع نمو وانتاج الحامض من قبل سلالات الطافرات البطيئة بشكل كبير إذ انخفض الرقم الهيدروجيني وارتفع العدد الحي خلال وقت الحضن عما هو عليه عند تنميتها في الحليب غير المضاف له مهضوم الكازين ، يظهر ذلك تأثير إضافة مهضوم الكازين في تدعيم نمو سلالات الطافرات البطيئة ، كما انه يعطي دليلا إضافيا على إن تلك السلالات تمتلك الطراز الوراثي -Lac+ Pro . فتوفر المصدر النيتروجيني جعل سلوكها في النمو وانتاج الحامض مشابه لسلوك السلالة الأصلية . كما تظهر النتائج في الجدول (6) عدم وجود تناسب طردي بين نسبة مهضوم الكازين المضافة للحليب وبين الارتفاع في العدد الحي في المزارع التي أضيف لها تركيز أعلى من مهضوم الكازين ، فلم يوجد نمط معين من الاختلاف بالكثافة العددية لسلالات الطافرات البطيئة خلال وقت الحضن وكذلك في نمط إنتاج الحامض من قبلها في المزارع التي تحتوي على تركيز أعلى من مهضوم الكازين ، وسبب ذلك يرجع إلى أن التركيز الاقل المستعمل في الدراسة (1%) قد يكون أكبر من

الحد الادنى المطلوب من قبل السلالات البطيئة لسد متطلبات النتروجين الجاهز ، فلو استخدمت مديات أقل من 1% من مهضوم الكازين سن المحتمل عندها ظهور التناسب الطردي بين النسب المتزايدة من مهضوم الكازين ونسب الارتفاع بالعدد الحي . يستنتج من ذلك إن إضافة مهضوم الكازين إلى الحليب المعد لتحضير البادئ الصناعي بمقدار 1% يجعل نمو سلالات الطافرات البطيئة تحت الدراسة مشابه لنمو السلالة اللاصلية CH-1 ليتسنى استخدام تلك السلالات البطيئة في الصناعة بشكل أوسع (26).

جدول 6. تأثير إضافة تراكيز مختلفة من مهضوم الكازين إلى الحليب في نمو السلالات البطيئة وتطور الرقم الهيدروجيني خلال فحص الفعالية .

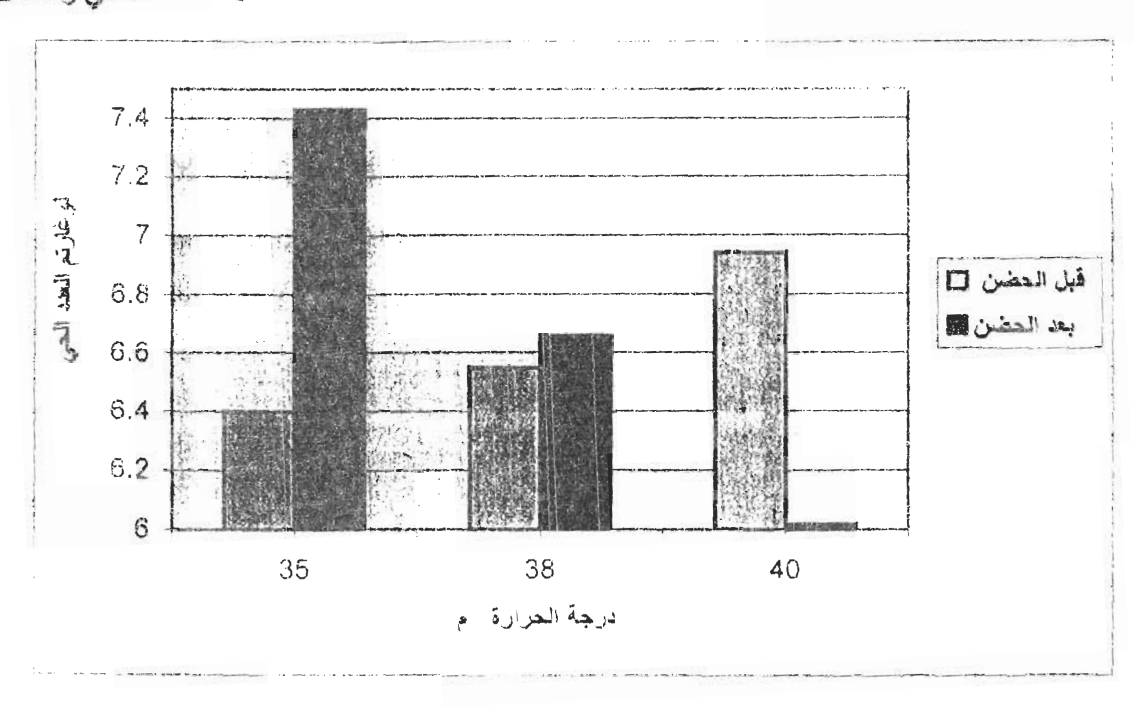
السلالة	وقت الحضن ساعة	تركيز مهضوم الكازين المضاف إلى مزرعة الحليب						حليب غير مضاف له مهضوم الكازين	
		1 %		3 %		5 %			
		العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH	العدد الحي (6^10)	pH
A 3	صفر	6.55	6.65	3.03	6.72	3.03	6.76	6.55	6.61
	2	45.2	5.45	38	5.99	72.5	6.08	9.75	6.39
	5	125	4.40	105	4.90	195	4.78	3.62	6.11
A 8	صفر	4.6	6.75	4.6	6.67	4.6	6.76	4.6	6.65
	2	11.7	5.27	13.1	5.55	15.4	5.65	10	6.41
	5	181	4.94	259	4.87	178	4.99	18	6.22
A 9	صفر	2.67	6.67	2.67	6.71	2.67	6.74	2.67	6.70
	2	16.7	5.85	91.5	5.67	54.5	6.01	9.75	6.53
	5	215	4.77	118	4.97	195	4.89	36.2	6.25
A 17	صفر	1.63	6.59	1.63	6.78	1.63	6.77	1.63	6.67
	2	19.7	5.03	16.6	5.76	14.1	5.80	17.7	6.25
	5	125	4.63	200	4.77	109	4.87	24	6.13
A 25	صفر	6.67	6.79	6.67	6.75	6.67	6.73	6.67	6.77
	2	62.5	5.65	30.8	5.47	58.5	5.63	10	6.42
	5	237	4.67	120	4.87	167	4.90	45	6.13
السلالة الأصلية CH-1	صفر	———	———	———	———	———	———	6.1	6.82
	2	———	———	———	———	———	———	141	5.70
	5	———	———	———	———	———	———	298	4.27

سابعا – التحري عن وجود الطافرات الذاتية الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في السلالة الأصلية CH-1 :- تم التحري عن وجود الطافرات الذاتية الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في السلالة الأصلية بإستعمال 24 مزرعة حليب متخثرة جرى منها فحص مامجموعه 10996 مستعمرة معزولة على وسط LIA (18) ، وظهر أن السلالة تحت الدراسة لاتحوي على طافرات ذاتية فاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز .

ثامنا – عزل طافرات -Lac المحثة بالحرارة المحددة للنمو من السلالة الأصلية :- يظهر الشكل (5) العدد الحي في مزارع LB للسلالة الأصلية عند تنميتها في درجات 35 م و38 م و40 م ويبدو منه واضحا إن درجة 38 م هي التي تمتلك تأثيرا محددا لنمو السلالة الأصلية تحت الدراسة sablethl temperature لذلك استخدمت في محاولات حث طافرات -Lac في مزارع LB للسلالة الأصلية . وبعد تخطيط المزارع التي تم تنميتها بدرجة 38 م لمدد 18 ساعة على وسط LIA أمكن الحصول على أعداد كبيرة من المستعمرات التي تعطي

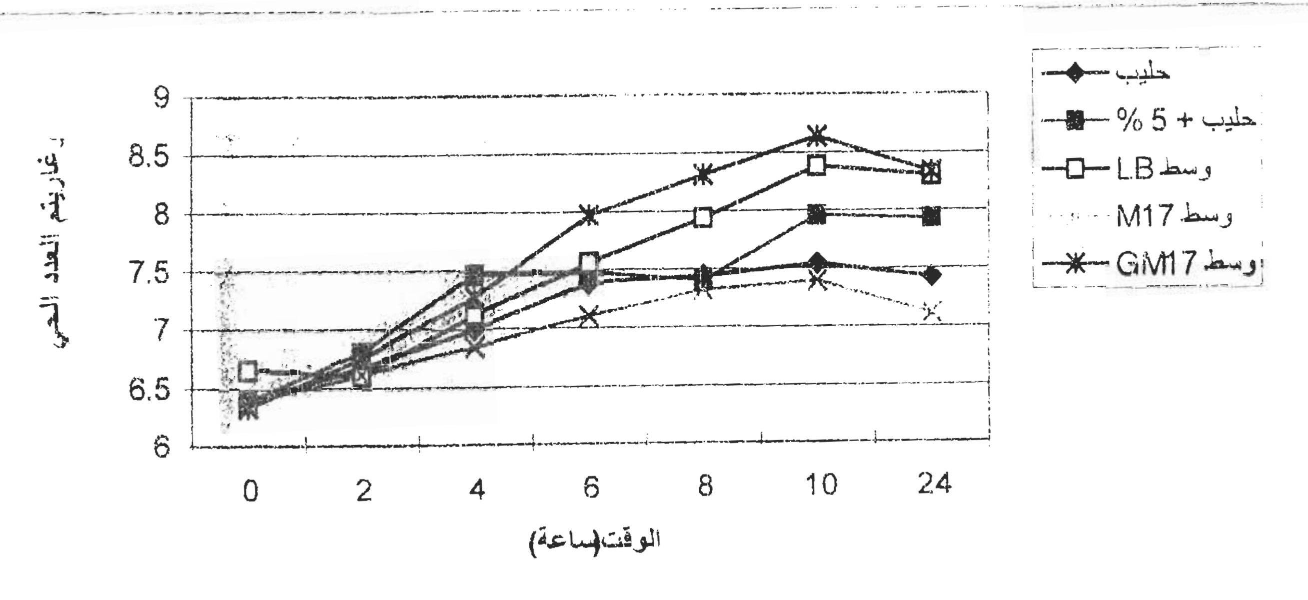
الصفات المظهرية لمستعمرات طـافرات -Lac (13) . أطلق على هذه العزلة اسم ALac-1 .

شكل 5. تأثير درجة الحرارة الحضن المرتفعة على نمو السلالة الأصلية CH-1 خلال 18 ساعة في وسط LB



1 -- منحنى نمو العزلة الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتـــوز في الحليب والحليــب المضـاف لــه 5% كلوكـوز والاوساط M17 و GM17 و LB: - يلاحـظ مـن الشكل (6) إن منحنى نمـو السـلالة ALac-1 فـي الحليب المدعم بالكلوكوز كان مرتفعا عن منحنى نموها في الحليب . وأن نمط النمو هذا يشير إلـى أن تلـك السلالة تمتلك الطراز الوراثي -Lac-Pro فالسـلالة فاقدة تماما لقدرة تأيض اللاكتـوز ، ولكـن إضافـة الكلوكوز يلغي تأثير عدم تأيض اللاكتوز من قبلـها ، وفي هذه الحلة لو كانت السلالة محتفظة بقدرتها علـى إنتاج أنزيمات البروتينيزات فإنها والحالة هذه لابـد أن

شكل 6. منحنى نمو السلالة A Lac-1 الفاقدة لقدرة تأيض اللاكتوز في كل من الحليب والحليب المضاف له 5%كلوكوز و الأوساط التركيبية M 17 و GM 17 و LB لمدة 24 ساعة بدرجة 30 م .

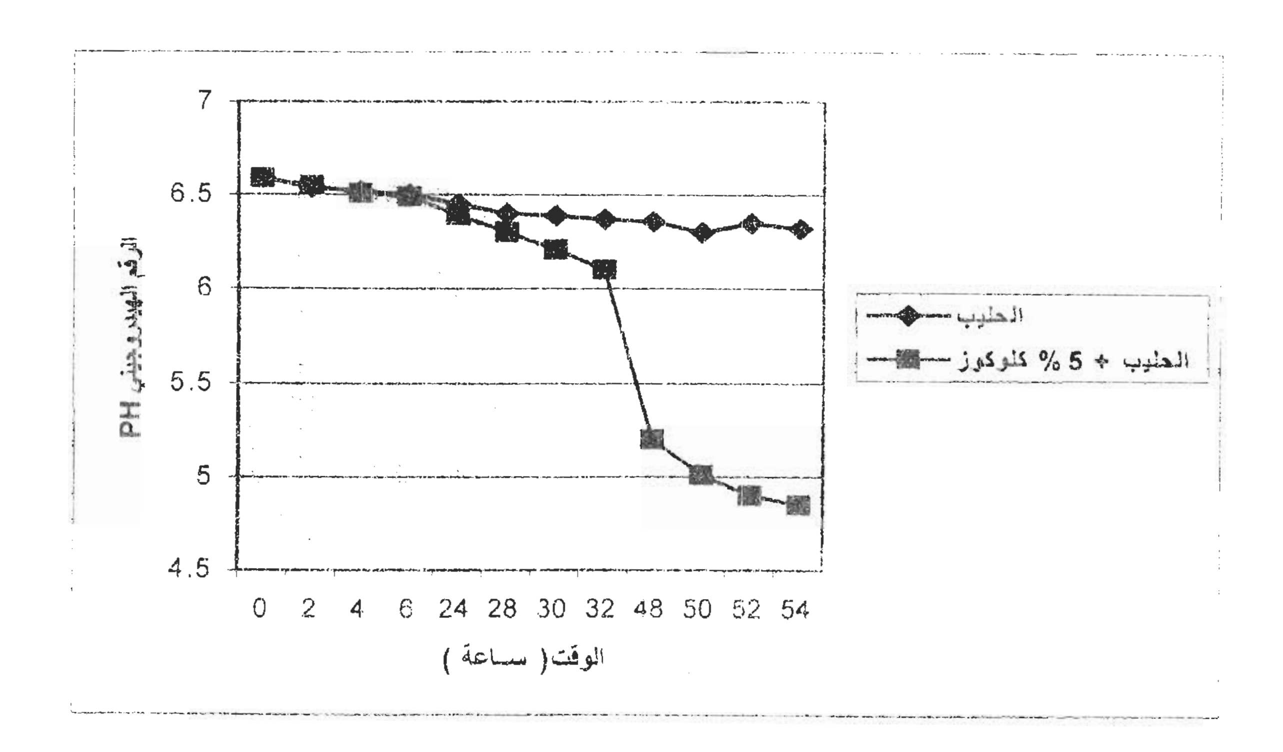


تشابه في نموها نمو السلالات السريعة في الحليب . لكن رغم ذلك استطاعت هذه السلالة زيادة كثافتها العددية في الحليب من 2.5×10^6 إلى 3.27 ×10^7 وحدة تكوين مستعمرة / مل بعد مرور 10 ساعات من التلقيح والحضن ، وقد يرجع ذلك إلى عملية الحمل caring over لوسط GM17 الذي أضيف مع اللقاح إلى مزرعة الحليب كما أن الحليب المستعمل في التنمية يحتوي على مقدار من النيتروجين غير البروتيني بشكل حوامض أمينية حرة وببتيدات قصيرة السلسلة وعلى نسبة من الكلوكوز نتيجة للمعاملات الحرارية التي تعرض لها عند التعقيم مما يجعلها مصدرا سهلا للاستهلاك (11 ، 14) . كان وقت الجيل للسلالة ALac-1 في كل من الحليب والحليب المدعم بمقدار 5% كلوكوز 108 و 96 دقيقة على التوالي . يظهر الشكل (6) أيضا أن نمو السلالة في وسط GM17 قد ارتفع بمقدار 2.75 ضعفا عنه في وسط M17 بعد مرور أربع ساعات وبمقدار 18 ضعفا بعد مرور 10 ساعات ، وهذا يشير بشكل واضح إلى عدم قدرة السلالة ALac-1 على تأيض اللاكتوز حيث يختلف وسطي M17 و GM17 عن بعضهما بنوع مصدر الكاربون فالأول يحتوي على اللاكتوز والثاني يحتوي على الكلوكوز . كان وقت الجيل لهذه السلالة في الوسطين 150 و 78 دقيقة على التوالي . أما في وسط LB فان نمو السلالة كان متأخرا عن نموها في وسط GM17 ومتفوقا عنه في وسط M17 ، وفي جميع التجارب التي تم فيها استخدام وسط LB كان هناك طور ركود واضح استمر لمدة ساعتين ، دخلت بعده المزرعة الطور اللوغاريتمي الذي تطابق مع الطور اللوغاريتمي لمنحنى النمو في وسط GM17 لمدة ساعتين ثم انخفض عنه بعدها إلا أنه أصبح موازيا له حتى الدخول في طور الثبوت ، وكان العدد الحي في مزارع LB متخلفا عنه في مزارع GM17 بعد الساعة الرابعة من الحضن ، وكان وقت الجيل في وسط LB 84 دقيقة .

قد يرجع سبب تخلف منحنى النمو اللوغاريتمي للسلالة ALac-1 في وسط LB عنه في وسط GM17 (رغم احتواء الوسطين على نفس النسبة من الكلوكوز) إلى السعة البفرية التي يوفرها وسط GM17 (35).

2 - إنخفاض الرقم الهيدروجيني في الحليب و الحليب المضاف له 5% كلوكوز :- يلاحظ من الشكل (7) انه لا يوجد فرق كبير بين قابلية السلالة ALac-1 على خفض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز حتى بعد مرور 24 - 28 ساعة وحضن بدرجة 30 م ، إذ بلغ 6.40 و 6.39 على التوالي ، وفي الوقت الذي يبلغ فيها الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب 6.32 بعد مرور 54 ساعة من الحضن ، استمر الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب المضاف له 5% كلوكوز بالانخفاض إلا أنه لم يصل إلى مستوى تخثر حليب المزرعة إلا بعد مرور 40 - 48 ساعة من الحضن ، حيث أصبح الرقم الهيدروجيني 5.2 وبعد مرور 54 ساعة من الحضن إنخفض إلى 4.85 . أن عدم إنخفاض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب المضاف له 5% كلوكوز عند تنمية السلالة ALac-1 فيه إلى مستوى التخثر بعد مرور 10 ساعات من الحضن بدرجة 30 م يشير إلى أن تلك الإضافة لم تحفز نمو السلالة لتجعله مشابها لنمو السلالات السريعة ، وهذا دليل إضافي على أن السلالة ALac-1 تفقد أيضا قابلية إنتاج أنزيمات البروتينيز فهي تمتلك الطراز الوراثي Lac- Pro- .

شكل رقم 7. نمط انخفاض الرقم الهيدروجيني لمزرعة الحليب والحليب المضاف له 5% كلوكوز عند تنمية السلالة ALac-1 فيه



المصادر

1.Atlas, R.M. 1995. Hand Book of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, Inc., USA.

2.Breheng, S., M. Kanasaki,. A. J. Jillier and G.R. Jago 1975. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria .2-the uncoupling of acid production from growth. J.Dairy Sci .30: 145.

3.Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker . 1965. Comparisons of slow and fast acid producing *S.lactis*. J.Dairy sci. 48:14

4.Davidson, B.E., R.M. Lianos , M.R. Cancilla and A . J. Hiller. 1995 . Current research on genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. Int. Dairy J.5: 763.

5.Davies, J. G. 1965. Cheese. Basic Technology . Vol 1. J&A Churchall, Ltd., London.

6.Davis, F. L. and M. J. Gasson . 1981. Reviews of prograss of dairy science : genetic of lactic acid bacteria .J .Dairy Res.48:363.

7.Exterkate, F. A. 1976. Proteolytic system of slow lactic acid producing variant of

lactose fermentation in *S.lactis* NCDO1404 .J. Dairy Sci. 68:572.
22. Pritchard, G.G. 1993. Physiology and biochemistry of proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12:179.
23. Ray, B. 2002. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Inc., USA
24. Reid, J.R., T. Coolbear and G.G. Pritchard. 1993 Properties of PIII type cell wall proteinase released by lysozyme treatment of *Lac. lactis ssp cremoris*: a comparative study. FEMS. Microbial. Rev.Abst 12:p.69 D2.
25. Renault, P.1996. Genetic engineering strategies in lactic acid bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Bozoglu, T.F. and Ray, B., Eds. Springer, N.Y. USA. 1-35.
26. Richardson, G . H., C. A Erston, Kim, J. M. and C. Daly. 1983. Protenase negative variants of *S.creamoris* of cheese starter. J. Dairy Sci. 66:2278.
27. Samples, D R., R. L. Richter and C. W. Dill. 1984. Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: comparison of Hull mthod and trinitrobenzen sulfuric acid procedure. J. Dairy Sci. 67: 60.
28. Sandine, W. E., 1979. Bacteriophage for starter culture . In: Lactic Starter Technology. P. 42 – 47. Pfizer cheese monograph. Vol. 6. Pfizer Inc. NY.
29. Sandine, W.E., P.C. Radich and. P.R Elliker. 1972. Ecology of lactic streptococci. Review J. Milk Food Tech. 35: 176.
30. Sorensen, K.I., R. Larsen, A. Kibenich., M.P. Junge and E. Johansen. 2000. A food grade cloning system for industrial strains of Lactococcus lactis. Appl.Enviro. Microbiol.66: 1253.
31. Stainer, R.Y, M. Dondroff, and E.A. Adelberg. 1980. General Microbiology. Third edition. The whitefriars press. Ltd. London.
32. Steenson, L.R. and T.R. Klaenhammer. 1986.Plasmid heterogeneity in S.cremoris M12R: effect of protiolytic activity and host dependent phage replication. J. Dairy Sci.69: 2227.
33. Tamime, A.Y. 1990. Microbiology of starter culture In: Dairy Microbiology. Vol. 2. The microbiology of milk product, second edition. Robinson, R.K. ed. P.131.Elsevier Applied Science Publisher, London.
34. Thomas, T.D. and O.E Mills. 1981.Protiolytic enzyme of starter bacteria. Neth.Milk Dairy J.35: 255.
35. Tarzaghi, B. E. and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic

S.cremoris strain HP . Neth. Milk Dairy J. 30:3.
8. Fox, P.F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening . J. Dairy Sci. 72:1379.
9. Gasson, M.J. and F. L. Davies. 1984. The genetic of dairy lactic acid bacteria . In: Advances of microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented milk .
10. Grieve P.A., B.A. Lockie and J.R. Duttey.1983. Use of *S. lactis* C2 Lac – mutant in accelerating Cheddar cheese ripening. 1- isolation , growth and properties of a C2 Lac- variants .Aust .J. Dairy Technol .38:
11. Kamaly , K.M. and E.H. Marth . 1989 . Enzyme activity of lactic streptococci and their role in maturation of cheese. A review .J. Dairy Sci. 72: 1945.
12. Kok, J.1990.Gentic of proteolytic system of lactic acid bacteria. FMES. Microbiol. Rev . 87:15.
13. Larson, L. D. and L.L Mckay. 1978. Isolation and characterization of plasmid DNA in *S. cremoris* . Appl. Environ. Microbiol. 36.944.
14. Lawrence, R.C., T.D. Thomas and B.G. Terzagh . 1976. Reviews of the progress of dairy science: cheese starter. J.Dairy Res. 43.141.
15. Limsowtin, G. K. Y. , H. A. Heap and R. C. Lawrence. 1978. Heterogeneity among strains of lactic streptococci. N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 13:1.
16. Harrigan, W.F.and M.E. Mccance . 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
17. Hugenholtz, J., R. Splint, W.N Koning and J. Veldkamp. 1987. Selection of proteinase positive and proteinase negative variants of *S.cremoris*.Appl.Environ. Microbiol. 53:309.
18. Huggins, A.R. and W. E. Sandine. 1984. Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of lactic streptococci. J. Dairy Sci. 67.1674.
19. Mckay, L.L., K.A. Bladwin,. and F.A. Zottoia. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. Appl. Microbial 23:1090
20. Mckay, L.L. and F.A. Bladwin. 1990. Applications for biotechnology: Present and future improvement in lactic acid bacteria. FEMS.Microbiol Rev. 87: 179.
21. Orberg, P.K. and W.E Sundine.1985. Plasmid linkage of protenase and

37.VonWright, A. and M. Sibacor. 1993. Modification of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria.P.161. Salriner, S. and vonWright, A. Eds. Marcel Dekker, Inc.NY.

streptococci and their Bacteriophage. Appl. Environ. Microbiol. 29: 807.

36.Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. J. Dairy Sci. 76:326.